

IFW

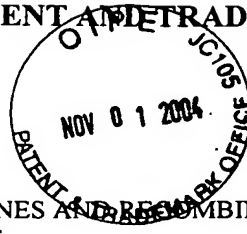
IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Keisuke FURUKAWA, et al.

SERIAL NO: 10/829,427

FILED: April 22, 2004

FOR: MODIFIED SARCOSINE OXIDASES, GENES AND RECOMBINANT DNAS THEREOF, AND METHODS FOR PREPARING THE SAME



GAU: 1632

EXAMINER:

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e):
- | <u>Application No.</u> | <u>Date Filed</u> |
|------------------------|-------------------|
|------------------------|-------------------|

☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

| <u>COUNTRY</u> | <u>APPLICATION NUMBER</u> | <u>MONTH/DAY/YEAR</u> |
|----------------|---------------------------|-----------------------|
| Japan | 2003-121533 | April 25, 2003 |
| Japan | 2003-396807 | November 27, 2003 |
| Japan | 2004-116345 | April 12, 2004 |

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
- Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.
Norman F. Oblon

Roland E. Martin
Registration No. 48,082

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 2 5 日
Date of Application:

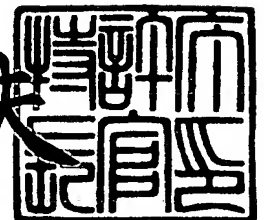
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 2 1 5 3 3
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 2 1 5 3 3]

願 人 キ ッ コ ー マ ン 株 式 会 社
Applicant(s):

2 0 0 4 年 4 月 1 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 1 3 0 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 P2319

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/06

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県野田市野田 2 5 0 番地キッコーマン株式会社内

 【氏名】 古川 圭介

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県野田市野田 2 5 0 番地キッコーマン株式会社内

 【氏名】 梶山 直樹

【特許出願人】

 【識別番号】 000004477

 【氏名又は名称】 キッコーマン株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100125542

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 鈴木 英之

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 027993

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 0304634

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 改変型ザルコシンオキシダーゼ、その遺伝子、組み換え体 DNA 及び改変型ザルコシンオキシダーゼの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 野生型ザルコシンオキシダーゼと比較して、酸性域での安定性が向上した改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 2】 pH 6.0、25℃、5 時間の熱処理後において 90 %以上、17 時間の熱処理において 70 %以上の残存活性を有する請求項 1 の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 3】 野生型ザルコシンオキシダーゼと比較して、酸性域でのザルコシンに対する反応性が向上した請求項 2 の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 4】 pH 6.5でのザルコシンオキシダーゼに対する K_m 値が 6 mM よりも小さい性質を有する請求項 3 の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 5】 下記の理化学的性質を有する改変型ザルコシンオキシダーゼ。

(a) 作用: 1 モルのザルコシンを加水分解し、1 モルのグリシン及び 1 モルのホルムアルデヒドを生成する。

(b) 至適 pH: 6.5 付近

(c) 安定 pH 範囲: 6.0 ~ 11.0

(d) 至適温度: 60℃

(e) 熱安定性: 50℃付近 (pH7.5)

(f) pH6.0での安定性: 25℃、pH6.0、5 時間で 90 %以上、25℃、17 時間で 70 %以上の残存活性

(g) 分子量: 約 43,000 (SDS-PAGE)

(h) K_m 値: ザルコシンに対し 5.9 mM (pH6.5)

【請求項 6】 以下の (a)、(b) 又は (c) の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸

が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質

(c) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を示すアミノ酸配列からなり、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質

【請求項 7】 以下の (a)、(b) 又は (c) の改変型ザルコシンオキシダーゼをコードするザルコシンオキシダーゼ遺伝子。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質

(c) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を示すアミノ酸配列からなり、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質

【請求項 8】 請求項 7 記載のザルコシンオキシダーゼ遺伝子をベクター DNA に挿入したことを特徴とする組み換え体 DNA。

【請求項 9】 請求項 8 記載の組み換え体 DNA を含む形質転換体又は形質導入体。

【請求項 10】 請求項 9 記載の形質転換体又は形質導入体を培地に培養し、培養物からザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、改変型ザルコシンオキシダーゼ、その遺伝子、組み換え体 DNA 及び改変型ザルコシンオキシダーゼの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ザルコシンオキシダーゼは、ザルコシンを加水分解してグリシン及びホルムアルデヒドを生成する触媒作用を有する酵素であり、ヒトの血清中又は尿中のクレアチニン量の測定に用いることができ、腎臓病をはじめとする各種の疾患の診断

薬として利用することができる。

従来、ザルコシンオキシダーゼは、コリネバクテリウム属【非特許文献 1 参照】、バチルス属【特許文献 1 参照】、シリンドロカーボン属【特許文献 2 参照】、シュードモナス属【特許文献 3 参照】、アースロバクター属【特許文献 4 参照】等の菌株により生産されることが知られている。しかしながら、通常の弱アルカリ側（pH7.5～8.0）のクレアチニン定量反応において、ビリルビンが測定値に影響を与え、測定上問題となっている。現在までに、バチルス属由来のザルコシンオキシダーゼ遺伝子に改変を行い、ビリルビンの影響の少ない弱酸性域での測定を目的とした弱酸性域に至適pHを有する遺伝子改変酵素【特許文献 5 参照】も知られているが、弱酸性域での安定性の点で実用的ではなかった。

【 0 0 0 3 】

【特許文献 1】

特開昭54-52789号公報

【特許文献 2】

特開昭56-92790号公報

【特許文献 3】

特開昭60-43379号公報

【特許文献 4】

特開平2-265478号公報

【特許文献 5】

特願平10-355482号公報

【非特許文献 1】

J.Biochem., 89, 599(1981)

【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように、クレアチニンあるいはクレアチンを酵素的に定量する際、血清、血液中に含まれる両物質の量は微量であるので、ビリルビン等の物質が影響すると測定値の信頼性が失われる。また、ビリルビン等の影響の少ない弱酸性域で測定を行った場合、安定性の低下をおこすことが知られている。酵素性質以外の

改良でこれらの問題を解決するためには、通常よりザルコシンオキシダーゼ活性処方量を増加させ、バッファー、添加物での安定性向上を行わなければならなかった。しかしながら、このような手段での改良は、測定試薬のコストを上げる恐れがあり、実用的な手段ではなかった。

【0 0 0 5】

【課題を解決するための手段】

そこで本発明者等は、上記課題解決のため鋭意検討を重ねた結果、バチルス由来のザルコシンオキシダーゼ遺伝子(特開平5-115281号公報の配列番号2に記載)の遺伝子改変を行った結果、弱酸性域での反応性が向上し、かつ安定性の向上したザルコシンオキシダーゼを取得することに成功し、本発明を完成した。

【0 0 0 6】

すなわち、本発明は、以下の発明を提供するものである。

(1) 野生型ザルコシンオキシダーゼと比較して、酸性域での安定性が向上した改変型ザルコシンオキシダーゼ。

(2) pH 6.0、25℃、5時間の熱処理後において90 %以上、17時間の熱処理において70 %以上の残存活性を有する項目(1)の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

(3) 野生型ザルコシンオキシダーゼと比較して、酸性域でのザルコシンに対する反応性が向上した項目(2)の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

(4) pH 6.5でのザルコシンオキシダーゼに対するKm値が6 mMよりも小さい性質を有する項目(3)の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

(5) 下記の理化学的性質を有する改変型ザルコシンオキシダーゼ。

(a) 作用：1モルのザルコシンを加水分解し、1モルのグリシン及び1モルのホルムアルデヒドを生成する。

(b) 至適pH：6.5付近

(c) 安定pH範囲：6.0～11.0

(d) 至適温度：60℃

(e) 熱安定性：50℃付近(pH7.5)

(f) pH6.0での安定性：25℃、pH6.0、5時間で90 %以上、25℃、17時間で70

%以上の残存活性

(g) 分子量: 約 43,000 (SDS-PAGE)

(h) Km 値: ザルコシンに対し 5.9 mM (pH6.5)

(6) 以下の (a)、(b) 又は (c) の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質

(c) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を示すアミノ酸配列からなり、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質

(7) 以下の (a)、(b) 又は (c) の改変型ザルコシンオキシダーゼをコードするザルコシンオキシダーゼ遺伝子。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質

(c) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を示すアミノ酸配列からなり、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質

(8) 項目 (7) 記載のザルコシンオキシダーゼ遺伝子をベクター DNA に挿入したことを特徴とする組み換え体 DNA。

(9) 項目 (8) 記載の組み換え体 DNA を含む形質転換体又は形質導入体。

(10) 項目 (9) 記載の形質転換体又は形質導入体を培地に培養し、培養物からザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼの製造法。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のザルコシンオキシダーゼは、ザルコシンオキシダーゼをコードする遺伝子を改変することにより得ることができる。改変に用いるザルコシンオキシダ

ーゼをコードする遺伝子は特に限定されない。本発明の具体例としては、例えば、バチルス属由来ザルコシンオキシダーゼ遺伝子（特開平5-115281号公報記載）等を挙げることができる。

【0008】

上記遺伝子を改変する手法としては既知の如何なる方法でもよく、例えば、前記のバチルス属由来ザルコシンオキシダーゼ遺伝子を含むザルコシンオキシダーゼ発現プラスミド（pSOM1）（特開平5-115281号公報記載）に、ハイドロキシルアミン、亜硝酸等の化学変異剤を接触させる方法又はPCR法を用いてランダムに変換する方法等の点変異、市販のキットを利用する部位特異的な置換又は欠失変異を生じさせるための周知技術である部位特定変異誘導法；この組み換え体プラスミドDNAを選択的に開裂し、次いで、選択されたオリゴヌクレオチドを除去又は付加し、連結する方法；オリゴヌクレオチド変異誘導法等が挙げられる。

【0009】

次いで、上記処理後の組み換え体DNAを脱塩カラム、QIAGEN（フナコシ社）等を用いて精製し、種々の組み換え体DNAを得る。

【0010】

このようにして得られた種々の組み換え体DNAを用いて、例えば、大腸菌K12、好ましくは大腸菌DH5 α 、大腸菌JM109（東洋紡社製）、XL1-Blue（STRATAGENE社製）を形質転換又は形質導入し、種々の変異の導入されたザルコシンオキシダーゼ遺伝子を保有する組み換え体DNAを含む形質転換体又は形質導入体を得ることができる。

【0011】

そして、例えば、形質転換体の場合、得られた形質転換体（その中に種々の変異ザルコシンオキシダーゼ遺伝子を含む組み換え体プラスミドDNAを含有している。）より、目的の性質を有するザルコシンオキシダーゼを生産する株を得るには、次のような方法を用いることができるが、これに限定されるものではない。

【0012】

先ず、得られた上記形質転換体をコロニー毎にTY寒天培地に移植して培養する

。この際、必要によりアンピシリン等の薬剤を添加してもよい。培養終了後、レプリカ布を使用して同上のTY寒天培地2枚に転写し、20時間程度培養し、ザルコシンオキシダーゼを生産させる。この際、必要によりIPTG等の誘導物質を添加してもよい。培養終了後、各プレートのコロニーにフィルターをかぶせて吸着させる。フィルターとしては、例えば、ハイボンドN+（アマシャムファルマシア社製）等を使用することができる。次いで、コロニーが転写されたフィルターを界面活性剤で湿らせた濾紙上に置いて溶菌処理を行う。溶菌処理を行ったフィルターはコロニーが流れないように乾燥させる。

【0013】

乾燥させた2枚のフィルターについて次の処理を行って、スクリーニングを行う。まず、一枚についてpH6.0のMES バッファーで湿らせた濾紙上において一晚処理する。フィルターを乾燥させた後、ザルコシン、ペルオキシダーゼ、Toos及び4-アミノアンチピリンを含む500mMTris-HClバッファー(pH7.7)に浸し紫色の発色度を観察する。残りの1枚について同溶液（但し100mM MESバッファー pH6.5）に浸し、紫色の発色度を観察する。

【0014】

上記二つのフィルターで検出結果を照合し、両方に活性のあるコロニーをピックアップする。その結果得られたコロニーを培養、遠心して集菌し、超音波破碎を行って培養上清を得る。その培養破碎上清に対し、pH6.0処理後の残存活性、pH6.5でのザルコシンに対する反応性を確認して目的の変異体を得る。このようにして、本発明の変異型ザルコシンオキシダーゼを得ることができる。

【0015】

また、上記微生物を培養する培地としては、例えば、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、大豆もしくは小麦麴浸出液等の1種以上の窒素源に、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄もしくは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。

【0016】

なお、培地の初発pHは、例えば、7～9に調整するのが適当である。また培養

は、例えば、30～42℃、好ましくは37℃前後で6～24時間、通気攪拌深部培養、振とう培養、静置培養等により実施するのが好ましい。培養終了後、該培養物より改変型ザルコシンオキシダーゼを採取するには、通常の酵素採取手段を用いることができる。

【0017】

培養物から、例えば、濾過、遠心分離等の操作により菌体を分離し、洗菌する。この菌体から改変型ザルコシンオキシダーゼを採取することが好ましい。この場合、菌体をそのまま用いることもできるが、超音波破碎機、フレンチプレス、ダイナミル等の種々の破壊手段を用いて菌体を破壊する方法、リゾチームの如き細胞壁溶解酵素を用いて菌体細胞壁を溶解する方法、トリトンX-100等の界面活性剤を用いて菌体から酵素を抽出する方法等により、菌体から改変型ザルコシンオキシダーゼを採取するのが好ましい。

【0018】

このようにして得られた粗酵素液から改変型ザルコシンオキシダーゼを単離するには、通常の酵素精製に用いられる方法が使用できる。例えば、硫酸塩析法、有機溶媒沈澱法、イオン交換クロマトグラフ法、ゲル濾過クロマトグラフ法、吸着クロマトグラフ法、電気泳動法等を適宜組み合わせて行うのが好ましい。

【0019】

(酵素活性)

本酵素の活性の測定は、下記条件下で行った。なお、1分間に1マイクロモルの尿素を生成する酵素活性を1単位とする。

(試薬調製)

反応用試薬として、以下の溶液を調製した。

- 1) 0.2M ザルコシン, 100mM Tris-HCl, 2 mM KCl, 0.05% Triton-X100 pH7.7
- 2) 80U/ml POD溶液
- 3) 0.2% phenol 溶液
- 4) 0.2% 4-アミノアンチピリン溶液
- 5) 0.3% SDS 溶液
- 6) 20mM Tris-HCl, 1mM KCl, 0.2% BSA pH7.7 (酵素希釈液)

次いで、上記各溶液を以下の数量混合し、活性測定液を調製した。

- 1) 5ml
- 2) 1ml
- 3) 2ml
- 4) 1ml

【 0 0 2 0 】

測定は、以下のようにして行った。

- 1) 活性測定液 0.95 mlを37℃、5分間プレインキュベーションする。
- 2) 酵素液 (0.04U/ml～0.16U/mlに酵素希釈液で調整) 0.05 mlを添加混合する。
- 3) 37℃において10分間反応させる。
- 4) 10分間の反応後、上記0.3% SDS 溶液を混合する。
- 5) 25℃にて10分間放置後、495 nmの吸光度を測定する。(OD_{sample})

ブランク値は、酵素液の混合前に 0.3% SDS 溶液を混合することによって測定する。OD_{blank})

(活性換算式)

$$U / m l = (O D_{sample} - O D_{blank}) \times 0.95$$

【 0 0 2 1 】

【実施例】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明する。

(実施例 1)

組み換え体プラスミドDNA (pSOM1) の含まれる大腸菌E.coli JM109(pSOM1) (FERM BP-3604)をLB培地 (DIFCO社製) にて培養し、菌体を集菌した後、その菌体からQIAGEN(QIAGEN社製)を使用して組み換え体プラスミドpSOM1を抽出、精製した。得られたプラスミドは、約100 μ gであった。

【 0 0 2 2 】

得られたプラスミドをもとにN末端、C末端用プライマー (配列番号3及び4) を用いてエラープロンPCRを行った。具体的には、これらのプライマーにてマンガン濃度0.075mM下でEx-taq (宝酒造社製) を使用し、pSOM1に対してPCR増幅反応を行った。

反応終了後、種々な変異の導入されたザルコシンオキシダーゼ遺伝子増幅断片をBamHI及び Spe Iにて制限酵素処理した後、未変異pSOM1のBam HI及び Spe I消化物のベクター側（長鎖断片）にT4リガーゼ（ベーリンガー社製）を用いてライゲーションした。

ライゲーション終了後、反応液をコンピテントHi E.coli JM109（東洋紡社製）で形質転換し、変異体ライブラリーを作製した。

次いで、その変異体ライブラリーをアンピシリン 50 μ g/ml TYを含む寒天培地プレートに移し、37℃にて一昼夜培養した。培養後、殺菌したレプリカ布を用い、複製プレートを2枚のTY寒天培地（アンピシリン 50 μ g/ml、1mM IPTGを含む）にて作製し、一昼夜、37℃で培養した。

培養終了後、4℃にて20分間プレート冷却を行い、その上からハイボンドN+（アマシャムファルマシア社製）を被せてコロニーをフィルターへ転写した。コロニーを移したフィルターをバグバスター（宝酒造社製）で湿らせた濾紙上においてフィルター上でコロニーを溶菌した。溶菌させたフィルターを37℃恒温機内で乾燥を行った。

【 0 0 2 3 】

乾燥したフィルターの一枚について、pH6.0の100mM MESバッファーで湿らせた濾紙に置き、25℃で一晩の処理を行った。処理終了後、フィルターを乾燥させて100mM ザルコシン（東京化成社製）、500mM Tris-HCl（和光純薬社製）、pH7.7, 0.2mM Toos（同仁化学研究所）、0.16mM 4-アミノアンチピリン（東京化成社製）及び10U/ml POD（キッコーマン社製）で発色反応を行った。フィルター上の発色がコントロール株と比較して高いものを、酸性条件下での安定性に優れた酵素の生産候補株として選択した。

【 0 0 2 4 】

もう一枚のフィルターについて、0.12 mM ザルコシン（東京化成社製）、100mM MES（同仁化学研究所）、0.2mM Toos（同仁化学研究所）、10U/ml POD（キッコーマン社製）及び0.16mM 4-aminoantipyrine（東京化成社製）（pH6.5）で湿らせた濾紙上で発色反応を起こさせ、いち早く発色が増加した株を、酸性条件下での反応性に優れた酵素の生産候補株として選択した。上記操作により、酸性条件下での

安定性に優れ、かつ反応性も優れている候補株を選択した。

選択した株について2ml TY培地（50 μ g/mlアンピシリン、1mM IPTGを含む）にて培養を行った。18～24時間の培養の後、遠心分離にて菌体を集菌して20mM Tris-HCl pH8.0, 1mM KCl, pH7.7に置換して超音波破碎を行い、遠心分離（12000 r.p.m.、3分間）を行った。得られた破碎上清を、pH 7.7条件下及びpH6.5条件下で活性測定し、pH6.5下での値がpH7.7下での値に近い変異体を選択した。

次いで、pH6.5での反応が高い株の破碎上清の、弱酸性域での安定性を評価した。100mM MES、pH6.0 0.9mlに対し、破碎液0.1mlを添加して25℃、15時間処理を行った。処理終了後、処理液0.1mlを200mM Tris-HCl (pH7.7)、1mM KCl及び0.2%BSA0.9mlで10倍に希釈し、活性の測定を行った。

上記の操作により、pH6.5での反応性が向上し、かつ安定性も向上していた変異酵素を作製した。上記変異体の改変されたザルコシンオキシダーゼ遺伝子を保持するプラスミドをpSOM3と命名した。プラスミドpSOM3は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにFERM BP-8370として寄託されている。

本プラスミドがコードしているザルコシンオキシダーゼの塩基配列をCEQ2000D NASequencing System（ベックマンコールター社製）を用いて決定したところ（配列番号2に記載）、本発明のザルコシンオキシダーゼは、61番目のグルタミン酸残基がリジン残基に、241番目のアスパラギン酸残基がグリシン残基に、324番目のグルタミン酸残基がヒスチジン残基に置換されていることがわかった。（配列番号1に記載）

【0025】

（実施例2）

上記のようにして得られた改変ザルコシンオキシダーゼ遺伝子を含む大腸菌(E. coli) JM109 (pSOM3) を、50 μ g/ml アンピシリンを含むTY培地（1% バクトトリプトン、0.5% バクトーイーストエクストラクト、0.5% NaCl、pH 7.5）100mlで16時間振とう培養した後、同様に調製した1LのTY培地（但し、1mM IPTGを含む）に10ml接種した。接種後、回転数120r.p.m.、37℃にて約20時間培養した。

【0026】

ステップ 1 (粗酵素液の調整)

培養終了後、培養液 1 L に対して遠心分離操作を行って菌体を集菌し、50ml の 20mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH 8.0 で菌体の懸濁を行った。そのようにして得られた菌体懸濁液に対して超音波破碎を行って菌体を破碎して粗酵素液を得た。

【 0 0 2 7 】

ステップ 2 (硫酸沈殿処理)

上記で得られた粗酵素 50ml に対して 20% の硫酸アンモニウムを加えて硫酸沈殿を行った。硫酸沈殿後 50mM KCl, 20mM Tris-HCl 及び 2mM EDTA の緩衝液に沈殿を溶解した。

【 0 0 2 8 】

ステップ 3 (DEAE-トヨパール イオン交換クロマト)

DEAE-トヨパール (TOSO 社製) 300ml を充填したカラムに上記粗酵素液を吸着させ、600ml の 100mM KCl, 20mM Tris-HCl, 2mM EDTA, pH 8.0 で洗浄した後、150mM KCl 20mM Tris-HCl, 2mM EDTA, pH 8.0 で溶出を行った。溶出終了後、精製度の高い画分を回収し、濃縮、150mM KCl, 2mM EDTA を含む 50mM リン酸バッファー pH 7.5 にて透析を行った。

【 0 0 2 9 】

ステップ 4 (セファデックス G-75 ゲルろ過処理)

150mM KCl 及び 2mM EDTA を含む 50mM リン酸バッファー pH 7.5 でバッファライズしたセファデックス G-75 (ファルマシア社製) 200ml を充填したカラムに、ステップ 3 で処理した酵素液 15ml をチャージしてゲルろ過を行った。得られた精製酵素の OD_{280nm} あたりの活性は、約 25 U であった。得られたザルコシンオキシダーゼの理化学的性質は、下記の通りである。

【 0 0 3 0 】

(実施例 3)

pH 安定性

50mM MES-NaOH (pH 5.5、6.0、6.5)

50mM リン酸カルシウムバッファー (pH 6.5、7.0、7.5、8.0)

50mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0、8.5、9.0)

50mM CHES-NaOHバッファー(pH 9.0、9.5、10.0)

50mM CAPS-NaOH(pH 10.0、10.5、11.0)

の各バッファー中にて25℃で5時間夫々処理した後、本酵素の残存活性を測定した結果、図1に示す通りであった。図1より、安定pH範囲は、pH 6.0～11.0であった。

【 0 0 3 1 】

至適 pH

50mM MES-NaOH (pH 5.5、6.0、6.5)

50mMリン酸カリウムバッファー(pH 6.5、7.0、7.5、8.0)

50mM Tris-HCl バッファー(pH 8.0、8.5、9.0)

50mM CHES-NaOHバッファー(pH 9.0、9.5、10.0)

の各バッファー中にて100mM ギルコシン、0.2mM Toos、0.16mM 4-アミノアンチピリン及び10U/ml パーオキシダーゼで反応させたところ、図2に示す通りであった。図2より、至適pHは、6.5付近であった。

至適温度

100mM Tris-HCl(pH7.7)下で100mMギルコシンと各温度で反応させた結果、図3に示す通りであった。図3より、至適温度は60℃付近であった。

熱安定性

50mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)を用い、各温度で10分間処理した場合の熱安定性の結果は、図4に示す通りであり、本酵素は、50℃付近迄安定であった。

Km値

ラインウエーバーバークの算出方法から各pHでのKm値は、以下のとおりであった。また、pH6.5、7.0では50mM MESバッファー、pH7.7においてはTris-HClバッファーを使用し、発色剤として0.2mM Toos、0.16 mM 4-アミノアンチピリン、10U/ml パーオキシダーゼで反応を行った。

その結果、各pHでのKm値は5.9 mM (pH6.5), 3.8 mM (pH7.0), 3.9 mM (pH7.7)であった。

【 0 0 3 2 】

(実施例4)

野生型及び改変型ザルコシンオキシダーゼ各1.2U/mlをpH6.5下で5 μ Mのザルコシンと37℃の反応を行った。反応液の組成は、50mM MES、60mM NaCl、0.2mM T oos、0.16mM4-アミノアンチピリン、20U/ml パーオキシダーゼとした。その結果を図5に示した。図5の通り、改変型ザルコシンオキシダーゼは、pH6.5下で野生型と比較して著しく良好な反応性を示した。

【0033】

(実施例5)

野生型及び改変型ザルコシンオキシダーゼを100mM MES(pH6.0)下で25℃にて17時間放置したところ、処理後の残存活性は、野生型が13.6%であったのに対し、改変型は、72.8%であった。

【0034】

【発明の効果】

本発明によれば、ザルコシンオキシダーゼ、特に、弱酸性域に至適pHと高い反応性を示すザルコシンオキシダーゼが効率よく製造でき、本発明は、産業上有用である。

【0035】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <110> KIKKOMAN CORPORATION
- <120> AN ENGINEER-TYPE SARCOSINE OXIDASE, AN ENGINEER-TYPE
SARCOSINE OXIDASE GENE, A RECOMBINANT DNA AND A PROCESS
FOR PRODUCING AN ENGINEER-TYPE SARCOSINE OXIDASE
- <130> P2319
- <160> 4
- <210> 1
- <211> 387
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<400> 1

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ser | Thr | His | Phe | Asp | Val | His | Val | Val | Gly | Ala | Gly | Ser | Met |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | | 15 |
| Gly | Met | Ala | Ala | Gly | Tyr | Tyr | Leu | Ala | Lys | Gln | Gly | Val | Lys | Thr |
| | | | | 20 | | | | | | 25 | | | | 30 |
| Leu | Leu | Val | Asp | Ala | Phe | Asp | Pro | Pro | His | Thr | Glu | Gly | Ser | His |
| | | | | 35 | | | | | | 40 | | | | 45 |
| His | Gly | Asp | Thr | Arg | His | His | Arg | His | Ala | Tyr | Gly | Glu | Gly | Arg |
| | | | | 50 | | | | | | 55 | | | | 60 |
| Lys | Tyr | Val | Pro | Phe | Ala | Leu | Arg | Ala | Gln | Glu | Leu | Trp | Tyr | Glu |
| | | | | 65 | | | | | | 70 | | | | 75 |
| Leu | Glu | Asn | Glu | Thr | His | Asn | Lys | His | Phe | Thr | Lys | Thr | Gly | Val |
| | | | | 80 | | | | | | 85 | | | | 90 |
| Leu | Val | Phe | Gly | Pro | Lys | Gly | Glu | Ser | Asp | Phe | Val | Ala | Glu | Thr |
| | | | | 95 | | | | | | 100 | | | | 105 |
| Met | Glu | Ala | Ala | Ala | Glu | His | Ser | Leu | Thr | Val | Asp | Leu | Leu | Glu |
| | | | | 110 | | | | | | 115 | | | | 120 |
| Gly | Asp | Glu | His | Asn | Thr | Arg | Trp | Pro | Gly | His | Thr | Val | Pro | Glu |
| | | | | 125 | | | | | | 130 | | | | 135 |
| Asn | Tyr | Asn | Ala | Ile | Phe | Glu | Pro | Asn | Ser | Gly | Val | Leu | Phe | Ser |
| | | | | 140 | | | | | | 145 | | | | 150 |
| Glu | Asn | Cys | His | Arg | Ser | Tyr | Arg | Glu | Leu | Ala | Val | Ala | Lys | Gly |
| | | | | 155 | | | | | | 160 | | | | 165 |
| Ala | Lys | His | Leu | Thr | Tyr | Thr | Arg | Val | Glu | Asp | Phe | Glu | Val | Ser |
| | | | | 170 | | | | | | 175 | | | | 180 |
| Gln | Asp | Gln | Val | Lys | His | Gln | Thr | Ala | Asn | Gly | Ser | Tyr | Thr | Ala |
| | | | | 185 | | | | | | 190 | | | | 195 |
| Asp | Lys | Leu | Ile | Val | Ser | Met | Gly | Ala | Trp | Asn | Ser | Lys | Leu | Leu |
| | | | | 200 | | | | | | 205 | | | | 210 |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| Ser Lys Leu Asn Leu Asn Phe Pro Leu Gin Pro Tyr Arg Gin Val | | | |
| | 215 | 220 | 225 |
| Val Gly Phe Phe Asp Ser Asn Glu Ala Lys Tyr Ser Asn Asp Val | | | |
| | 230 | 235 | 240 |
| Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Lys Gly His Tyr Tyr | | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys His Gly Tyr His | | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| Thr Tyr Gly Gin Gin His Asp Pro Asp Thr His Asn Arg Glu Phe | | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| Gly Ala Tyr Gin Glu Asp Glu Ser Asn Leu Arg Asp Phe Leu Glu | | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| Lys Tyr Met Pro Glu Ala Asn Gly Glu Leu Lys Arg Gly Ala Val | | | |
| | 305 | 310 | 315 |
| Cys Met Tyr Thr Lys Thr Pro Asp His His Phe Val His Asp Thr | | | |
| | 320 | 325 | 330 |
| His Pro Glu His Ser Asn Val Phe Val Ala Ala Gly Phe Ser Gly | | | |
| | 335 | 340 | 345 |
| His Gly Phe Lys Phe Ser Ser Val Val Gly Glu Val Leu Ser Gin | | | |
| | 350 | 355 | 360 |
| Leu Ala Thr Thr Gly Lys Thr Glu His Asp Phe Ser His Phe Ser | | | |
| | 365 | 370 | 375 |
| His Asn Arg Pro Ala Leu Lys Gin Lys Thr Thr His | | | |
| | 380 | 385 | 387 |

<210> 2

<211> 1164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

atgagtacac attttgatgt gattgttggt ggagcaggat caatgggaat ggctgcaggg 60
tactatitag caaaacaagg agtcaaaaca ttattgggtg atgcattcga tccgccgcat 120
acagaaggaa gccatcacgg tgatactcgc attatccgcc atgcttacgg tgaaggaaga 180
gaatatgttc catttgact aagagcacia gaattatggt atgaactga aaatgaaaca 240
cacaataaga tttttacaaa aacaggcggt ctagtttttg gtccgaaagg tgaatccgat 300
ttcgttgccg aaacaatgga ggcagctgca gaacattcat tgatcgtgga ttacttgag 360
ggtgatgaaa tcaatacgcg ctggcccggc ataacgggtc ctgaaaacta taatgcaatt 420
tttgaaccaa attcaggcgt attgttcagt gagaattgta ttcgttcata ccgtgagctg 480
gctgtagcaa aaggagcaaa aattttaaca tatactcgtg ttgaggattt tgaagtttct 540
caagaccaag ttaaaatcca aacggcaaat ggatcgtaca cagctgataa attaatcgta 600
agtatgggtg cttggaatag taaactactt tctaaattaa atcttgacat cccattacag 660
ccataccgcc aagtgtagg attttttgat tctaatagaag caaagtacag caatgatgtg 720
gattatccag cattcatggt agaagtacca aaaggtattt attacggatt cccaagcttc 780
ggtggctgcg gtttgaaaat agggatatcat acgtatggtc aacaaatcga ccctgatacg 840
attaaccgtg aatttggtgc ttatcaagag gatgaaagta atcttcgcga tttcttgga 900
aaatatatgc cagaagcaaa tggcgagtta aaacgaggcg cagcttgat gtacacgaaa 960
acaccagatg aacatttcgt gattgatact catccagaac attccaatgt tttcgtagca 1020
gctggtttct ctggacacgg ctttaaat tcaagtgtag tcggtgaagt gttaagtcaa 1080
ttagcgacaa caggtaaaac agaactgat atttcaattt tctcaataaa tcgtcctgct 1140
ttaaaacaga aaacaacgat ttaa 1164

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gtaccggatc cgctagcttt ac 22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

cgacggccag agatctacta g 21

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明改変型ガルコシンオキシダーゼの安定 p H 範囲を示す図。

【図 2】

本発明改変型ガルコシンオキシダーゼの至適 p H を示す図。

【図 3】

本発明改変型ガルコシンオキシダーゼの至適温度を示す図。

【図 4】

本発明改変型ガルコシンオキシダーゼの熱安定性を示す図。

【図 5】

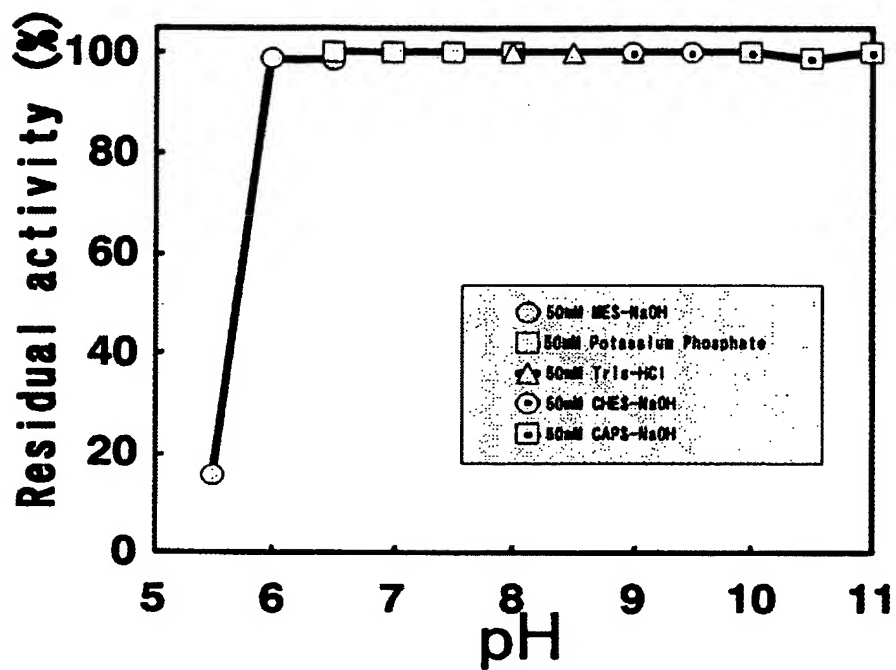
本発明改変型ガルコシンオキシダーゼ及び野生型ガルコシンオキシダーゼの反応性を示す図。

【書類名】

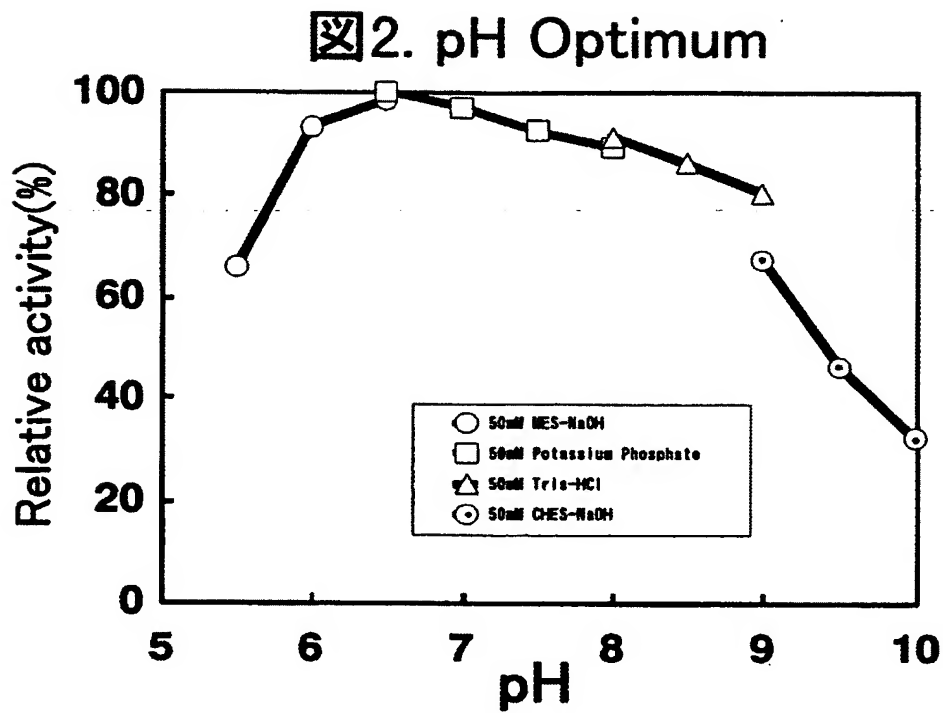
図面

【図 1】

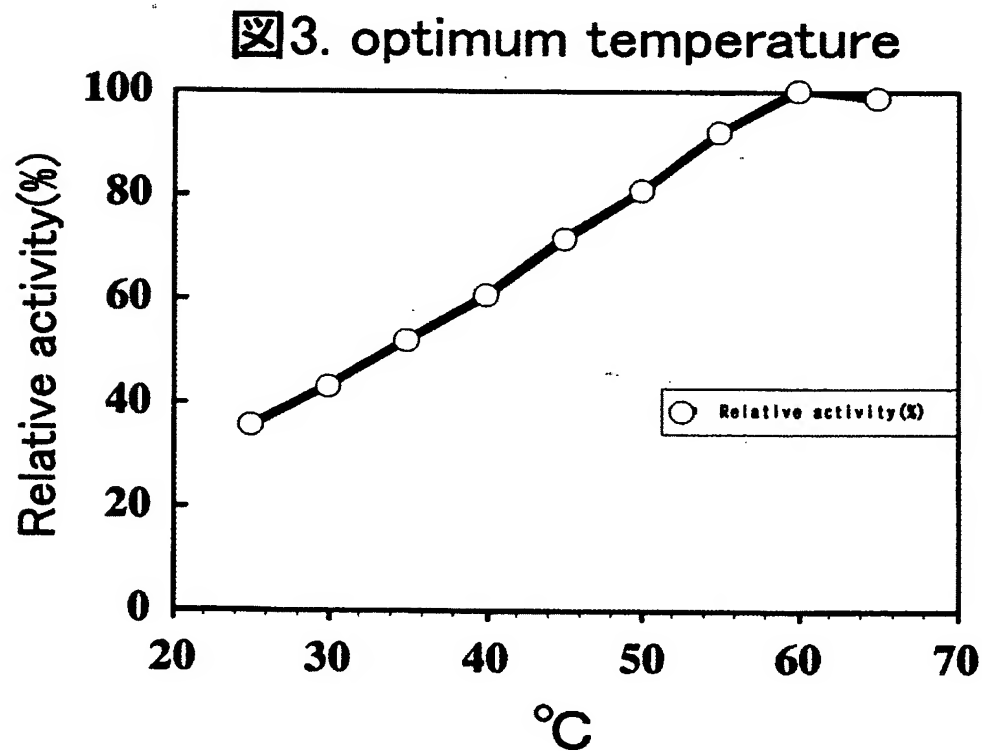
図 1. pH Stability



【図 2】

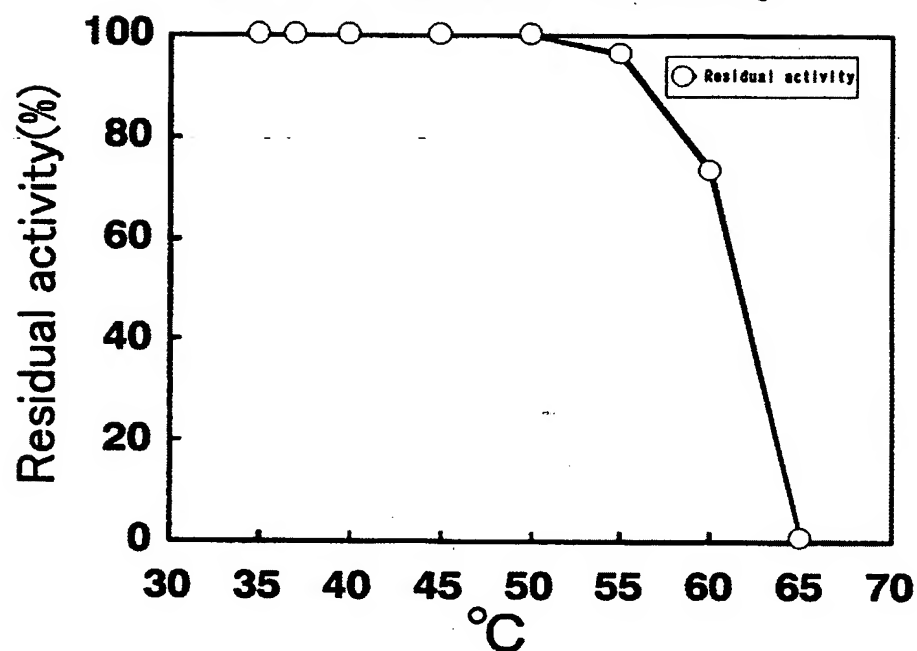


【図 3】

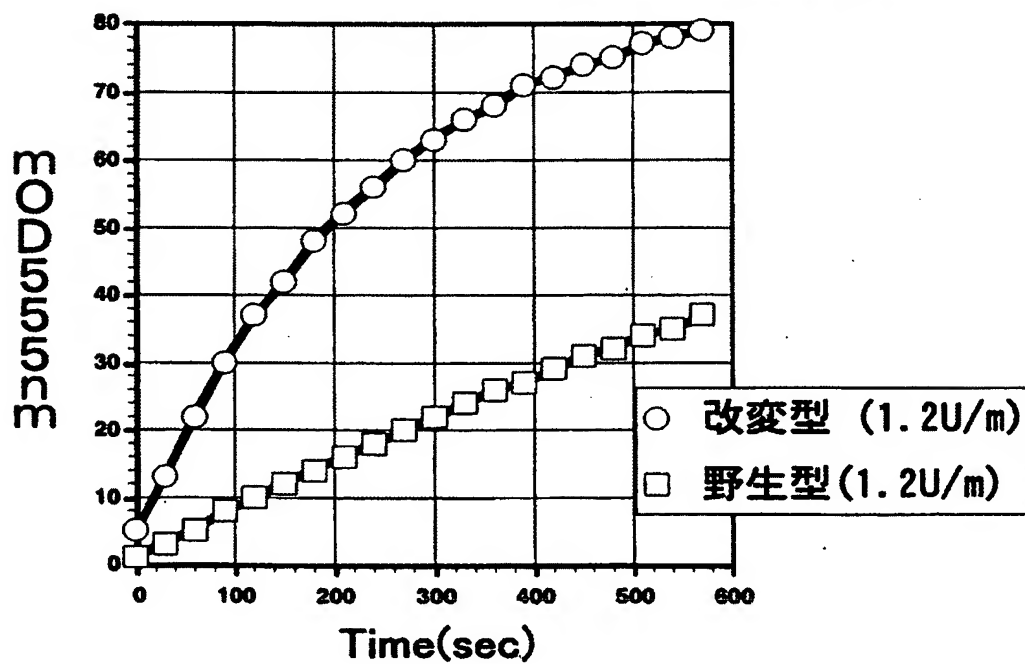


【図 4】

図4. Thermal stability



【図 5】

図5. 5 μ M ギャラクシンと各酵素の反応経過

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】

(1) 野生型ガルコシンオキシダーゼと比較して、酸性域での安定性が向上した改変型ガルコシンオキシダーゼ。

(2) 以下の (a)、(b) 又は (c) の改変型ガルコシンオキシダーゼをコードするガルコシンオキシダーゼ遺伝子。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、ガルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質

(c) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を示すアミノ酸配列からなり、ガルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質

【効果】 本発明によれば、ガルコシンオキシダーゼ、特に、弱酸性域に至適 pH と高い反応性を示すガルコシンオキシダーゼが効率よく製造でき、本発明は、産業上有用である。

【選択図】 なし。

認定・付加情報

| | |
|---------|--------------------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2 0 0 3 - 1 2 1 5 3 3 |
| 受付番号 | 5 0 3 0 0 6 9 9 3 7 0 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第五担当上席 0 0 9 4 |
| 作成日 | 平成 1 5 年 4 月 2 8 日 |

< 認定情報・付加情報 >

| | |
|-------|-------------|
| 【提出日】 | 平成15年 4月25日 |
|-------|-------------|

次頁無

特願 2 0 0 3 - 1 2 1 5 . 3 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 4 4 7 7]

| | |
|----------|---------------------|
| 1. 変更年月日 | 1 9 9 9 年 8 月 1 6 日 |
| [変更理由] | 住所変更 |
| 住 所 | 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 |
| 氏 名 | キッコーマン株式会社 |